

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 809 313

(21) N° d'enregistrement national :

01 06899

(51) Int Cl⁷ : A 61 L 27/24, C 12 N 5/08, A 61 L 27/40, 27/56, 27/60

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(12)

(22) Date de dépôt : 25.05.01.

(30) Priorité : 26.05.00 FR 00006748; 26.05.00 FR
00006743.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 30.11.01 Bulletin 01/48.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : COLETICA Société anonyme — FR.

(72) Inventeur(s) : ABDUL MALAK NABIL, ANDRE VALE-
RIE et HUC ALAIN.

(73) Titulaire(s) :

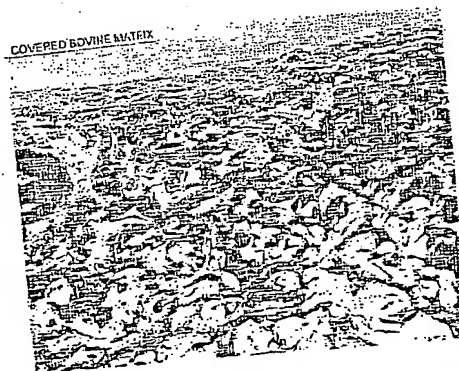
(74) Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

(54) PROCÉDES DE PRÉPARATION DE NOUVEAUX SUPPORTS A BASE DE COLLAGÈNE POUR L'INGÉNIEURIE
TISSULAIRE ET BIOMATÉRIAUX OBTENUS.

(57) L'invention concerne un produit composite formant un
support collagénique comprenant au moins une couche po-
reuse collagénique revêtue sur au moins une face d'une
membrane essentiellement compacte collagénique réalisée
soit par un film collagénique préparé par séchage, de préfé-
rence à l'air ou dans un fluide gazeux, d'un gel de collagène,
soit par une éponge collagénique très fortement compri-
mée.

Avantageusement, au moins une des deux couches,
respectivement la couche poreuse et la membrane essen-
tiellement compacte, comprend des cellules vivantes, nor-
males ou modifiées génétiquement, ou malignes, en
particulier provenant de sujets jeunes ou âgés.

L'invention permet de fournir un produit composite for-
mant un support collagénique pour la fabrication de peaux
artificielles destinées notamment à réaliser des essais in
vitro d'efficacité de substances potentiellement actives, ou
à reconstruire in vivo des zones de peaux endommagées.



2 809 313 - A1

BEST AVAILABLE COPY

Depuis de nombreuses années, le collagène s'est révélé être un substrat irremplaçable pour la réalisation de tissus artificiels renfermant des cellules vivantes.

Les biomatériaux obtenus sont de plus en plus utilisés dans le domaine pharmaceutique et leur avenir semble très prometteur pour la préparation des tissus conjonctifs lésés ou pour la thérapie génique en permettant l'introduction et la survie de cellules modifiées dans un organisme vivant.

De plus pour des tests « in vitro », les industries cosmétique et dermo-pharmaceutique font de plus en plus appel aux peaux reconstruites et ceci, d'autant plus, que dans ces disciplines, les tests sur animaux sont de moins en moins utilisés.

C'est pourquoi, plusieurs équipes de recherche dans le monde se sont efforcées de mettre au point des supports à base de collagène pour la réalisation de tissus artificiels vivants, tels que des peaux, des cartilages, des os, des tendons ou des cornées reconstruites. Les domaines d'application de ces nouveaux biomatériaux sont donc nombreux.

Il est à noter que les principaux travaux réalisés dans le domaine concerné par l'invention sont dus principalement aux équipes de : Yannas I., Collombel C., Tinois E., Boyce S., Eisenberg H., Bell E., Kuroyanagi Y., Maruguchi T., Hanthamrongwit M., Auger F.A., et Osborne C.S., par exemple voir brevet US 5,273,900.

Tous ces chercheurs utilisent soit des gels, soit des éponges de collagène, ces dernières étant obtenues par lyophilisation.

Il est connu par le document WO 99/19005 une membrane multicouches comprenant une couche de matrice à prédominance en collagène II ayant une texture en éponge recouverte sur au moins une face et de préférence sur les deux faces, d'au moins une couche barrière ayant une texture fermée, relativement imperméable.

Il ressort du texte que la couche barrière est constituée par une membrane animale naturelle (voir page 7, lignes 23 à 32 et page 8, lignes 10 à 30).

Cette couche barrière a pour but d'empêcher la pénétration et donc la croissance de cellules de tissus natives car cette membrane est dédiée à la reconstruction de l'os ou surtout du cartilage, de sorte qu'il est nécessaire d'utiliser

comme matériau prédominant de sa couche poreuse du collagène II obtenu à partir de cartilage, de préférence de cartilage hyalin de porc (voir page 7, lignes 14-16).

Il est à noter que les cellules de cartilage ou les chondrocytes ont une vitesse de multiplication ou de régénération beaucoup plus lente que la vitesse de régénération des cellules des tissus mous tels que les fibroblastes et, de ce fait, il est nécessaire de les isoler pour leur permettre de croître en évitant d'être envahi par les cellules à croissance rapide des tissus mous. Ce document aboutit à cette solution en utilisant une couche barrière étanche aux cellules qui protège la croissance des cellules de collagène II qui favorisent la croissance des chondrocytes (voir page 2, lignes 15 à 20).

Dans le cadre de la présente invention décrite plus loin, il est préparé initialement un matériau bicouches dont chaque couche est capable de permettre la croissance de cellules vivantes humaines, ce qui constitue une solution non évidente et totalement inattendue par rapport à l'état de la technique.

Le document WO 96/08277 est relatif à l'utilisation d'une membrane collagénique comme prothèse de régénération péritonéale, constituant une invention antérieure du même déposant. Dans ce document, un mode de réalisation préféré est une membrane mixte comprenant une éponge de collagène sur laquelle a été collé un gel de collagène, la membrane étant obtenue par séchage du gel de collagène dans un fluide gazeux non toxique, voir en particulier l'exemple II, pages 12 et 13 de cette demande PCT.

Cependant, dans l'exemple II, il ressort que l'éponge obtenue est comprimée pendant 15 secondes sous une pression de 150 bars et que la membrane mixte est formée en coulant un gel de collagène à 1 % sur cette éponge comprimée, ce gel étant ensuite séché à l'air libre.

Compte tenu de la compression de l'éponge obtenue pendant 15 secondes sous une pression de 150 bars, la membrane mixte obtenue est en fait réalisée à partir de deux couches essentiellement compactes, ce qui constitue une structure différente de celle objet de la présente invention. Par ailleurs, dans le cas de la présente invention, il a été découvert de manière inattendue que la structure bicouche revendiquée était compatible avec un ensemencement d'au moins une couche avec des cellules humaines vivantes, en permettant leur conservation, ainsi que leur multiplication.

Il est à noter que le document FR 2 679 778 constitue une autre invention encore antérieure du même déposant similaire.

Le document EP 0 686 402 constitue encore un document antérieur du même déposant relatif à une membrane collagénique anti-adhérence post-opératoire comprenant deux couches, un support à base de collagène revêtu complètement d'une couche de gélatine, le mélange étant à l'état lyophilisé. Il est à
5 noter qu'ici la couche de gélatine a pour but critique de réaliser un effet de collage de la membrane évitant les adhérences et la gélatine a une résorption rapide par dissolution à 37°C en présence de cellules.

Le document EP 0 789 074 de L'OREAL est relatif à un équivalent de peaux comprenant des cellules de Langerhans.

10 Il est à noter que dans cette demande, le support proprement dit décrit à la colonne 4, page 3, est un support quelconque de l'art antérieur. Il peut être formé par des lattices mixtes collagène/fibroblaste, un derme préalablement désépidermisé, une membrane artificielle, un substitut sous-cutané à base de collagène, un plastique ou tout autre support compatible avec la viabilité cellulaire
15 (colonne 4, lignes 3 à 12).

Ce document est différent de la présente invention dans la mesure où il utilise un derme obtenu par délimination d'une peau, recouvert d'un mélange de kératinocytes humains préalablement isolés selon une méthode classique, mélangé à des mélanocytes humains également préalablement isolés selon une méthode
20 connue et que l'on soumet ensuite à une co-culture. Ce document ne prévoit pas de couche compacte telle que prévue dans le cadre de la présente invention et qui peut êtreensemencée de cellules vivantes humaines, combinées de manière critique avec une sous-couche poreuse qui est clairement différente d'un derme désépidermisé.

25 Enfin, le document WO 91/16010 décrit des équivalents de peaux vivantes composites consistant tout d'abord à acheter dans le commerce une membrane d'éponge de collagène bovin que l'on inocule de cellules de fibroblastes (voir page 8, troisième et quatrième paragraphes).

Après incubation, l'éponge est inversée et la surface supérieure est
30 laminée avec du collagène non poreux qui peut être traité à la pepsine (voir page 8 dernier paragraphe) qui est en général du collagène bovin. Il est indiqué que le traitement avec la pepsine a pour but d'enlever les télopeptides (page 9, quatre premières lignes). Le pH de la solution de collagène est ajusté à un pH neutre, ce qui permet de précipiter. Le collagène forme une couche de film mince sur
35 l'éponge et on cultive l'ensemble à 37°C pendant 60 minutes (page 9, dernière phrase du premier paragraphe).

Ensuite, des kératinocytes cultivés sont inoculés sur la couche laminée et on effectue encore une nouvelle culture à pH 7,2 et 35°C pendant 10 jours.

Dans le cadre de la présente invention, comme il résulte de la description suivante, la structure bicouche est formée initialement et est constituée de manière critique d'une éponge de collagène revêtue d'une couche compacte, cette couche compacte procurant des effets techniques inattendus comme résultant de la description suivante.

Les principales difficultés à surmonter pour la réalisation des supports destinés à l'obtention des tissus artificiels vivants sont les suivantes : bonne résistance mécanique, faible sensibilité à des températures avoisinant 37° C, propriétés biologiques favorables au développement et au métabolisme cellulaires, faible susceptibilité vis-à-vis de la dégradation enzymatique et, enfin, pour certaines applications et en particulier la peau reconstruite, présence préférable d'une structure bicouche dans laquelle l'une des couches est la plus compacte possible et l'autre poreuse.

Jusqu'à maintenant, les recherches effectuées n'avaient pas permis d'obtenir des supports collagéniques répondant de façon satisfaisante à l'ensemble des contraintes énumérées plus haut.

La présente invention a pour objet de résoudre ces problèmes restés en suspens tant sur le plan technique que sur le plan industriel.

La présente invention permet de résoudre l'ensemble de ces problèmes techniques d'une manière particulièrement simple, peu coûteuse, utilisable à l'échelle industrielle et en particulier à l'échelle industrielle cosmétique, dermo-pharmaceutique ou pharmaceutique.

Selon un premier aspect, la présente invention fournit un nouveau produit composite formant un support collagénique comprenant au moins une couche poreuse collagénique revêtue sur au moins une face d'une membrane essentiellement compacte collagénique réalisée soit par un film collagénique préparé par séchage, de préférence à l'air ou dans un fluide gazeux, d'un gel de collagène, soit par une éponge collagénique très fortement comprimée.

Selon encore une autre caractéristique avantageuse du produit composite selon l'invention, la compression de l'éponge collagénique comprimée est réalisée à une pression au minimum égale à environ 50 bars, équivalent à environ $50 \cdot 10^5$ Pascals (Pa), de préférence comprise entre 50 bars ($50 \cdot 10^5$ Pa) et 200 bars ($200 \cdot 10^5$ Pa), éventuellement cette compression ayant lieu à une température comprise entre 20 et 80 degré C°, encore mieux entre 40 C° et 60 C°.

Selon une caractéristique avantageuse, ce produit composite est caractérisé en ce que le produit collagénique précité est choisi parmi du collagène et un mélange de collagène avec un polysaccharide, en particulier un glycosaminoglycane, le chitosane, et les dérivés du chitosane, la cellulose et les dérivés de la cellulose, le dextrane et ses dérivés, un alginat, un dérivé d'un alginat, un carraghénane.

Selon encore une caractéristique avantageuse de ce produit composite, celui-ci est caractérisé en ce qu'au moins une des deux couches, respectivement la couche poreuse et la membrane essentiellement compacte, comprend des cellules vivantes, normales ou modifiées génétiquement, ou malignes en particulier provenant de sujets jeunes ou âgés.

Selon une variante de réalisation avantageuse, les cellules vivantes sont choisies parmi le groupe consistant de fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, en particulier macrophages ou lymphocytes, adipocytes, sébocytes, cellules osseuses, des chondrocytes, des ostéoblastes, cellules de Merkel d'origine sanguine, normales ou génétiquement modifiées ou malignes.

Selon encore une autre caractéristique avantageuse, le produit composite est caractérisé en ce qu'il contient des fibroblastes normaux ou génétiquement modifiés ou malins dans la couche poreuse et des cellules vivantes normales ou génétiquement modifiées ou malignes, à la surface de la membrane compacte en particulier choisies parmi des kératinocytes, des mélanocytes, des cellules de Merkel d'origine sanguine, des cellules de langerhans d'origine sanguine, des sébocytes, des cellules d'origine sanguine, des cellules nerveuses.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, il peut être particulièrement intéressant de préparer soit des peaux reconstruites "jeunes" en utilisant des cellules prélevées sensiblement exclusivement sur des sujets jeunes, soit des peaux reconstruites "âgées" obtenues à partir de cellules prélevées sensiblement exclusivement sur des sujets âgés. Grâce à ces modèles, il sera possible d'améliorer les connaissances sur le processus du vieillissement cutané et d'étudier l'influence d'actifs sur ce processus.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, la membrane essentiellement compacte est préparée préalablement à la combinaison avec la couche poreuse, de préférence comprenant une éponge collagénique, en particulier en préparant la membrane et en la déposant sur un gel

collagénique avant que l'ensemble ne soit congelé et lyophilisé pour obtenir ledit produit composite.

Selon encore un autre mode de réalisation du produit composite selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce que l'éponge collagénique et/ou le film collagénique et/ou la membrane collagénique, comprend du collagène d'origine
5 mammifère, en particulier d'origine bovine.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux du produit composite selon la présente invention, l'éponge collagénique et/ou le film collagénique et/ou membrane collagénique, comprend du collagène d'origine
10 marine, de préférence issu de peaux de poissons de la famille des téléostéens, plus particulièrement de poissons présentant des zones de peaux dépigmentées, encore plus particulièrement des poissons plats, encore mieux ceux qui sont pêchés de façon industrielle, comme par exemple la sole, la limande, le turbo, le barbus dont les peaux ventrales non pigmentées peuvent être facilement séparées par dépeçage.
15 La peau de poissons préférée comme source d'extraction du collagène utilisable selon la présente invention est celle de la sole. La préparation de collagène à partir de peaux de poissons est en particulier décrite dans le document précédent du déposant EP 0 592 586 = US-A-5,420,248 auquel l'homme de l'art pourra se reporter. Il est particulièrement inattendu qu'une telle éponge collagénique et/ou
20 un film collagénique et/ou une membrane collagénique obtenue à partir de collagène d'origine marine, de préférence de la famille des téléostéens, puisse être biocompatible avec des cellules vivantes humaines utilisées pour la fabrication de peaux reconstruites et que ces cellules humaines vivantes puissent non seulement rester vivantes mais également être capables de se multiplier.

25 Selon un autre mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, le collagène d'origine mammifère, en particulier d'origine bovine, ou de préférence d'origine marine, en particulier de peaux de poissons de la famille des téléostéens peut être réticulé soit chimiquement, soit par réticulation physique comme cela sera décrit plus loin dans le cadre du procédé de fabrication. Il est
30 particulièrement inattendu qu'une telle réticulation puisse être utilisée dans le cadre de la réalisation d'un biomatériau biocompatible avec des cellules humaines qui sont utilisées dans la suite du procédé pour la fabrication de peaux reconstruites.

Par "biocompatible", on entend dans le cadre de la présente invention
35 que le biomatériau n'est pas toxique vis-à-vis des cellules vivantes humaines et qu'il permet aussi leur croissance ou multiplication. Il est à noter que la

réticulation a généralement pour effet de rendre le matériau non biocompatible, donc toxique pour les cellules vivantes et ne peut alors pas permettre leur croissance.

- 5 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux du produit composite selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce qu'au moins l'une des deux couches est réalisée à partir d'un gel collagénique contenant un mélange de collagène soluble et de collagène insoluble, par exemple sous forme de fibres.

Dans le cas du produit composite selon l'invention, le collagène peut être du collagène de type I et/ou de type III.

- 10 Selon un deuxième aspect, la présente invention couvre aussi un procédé de fabrication d'un produit composite comprenant au moins une couche poreuse collagénique revêtue sur au moins une face d'une membrane essentiellement compacte collagénique, caractérisé en ce que :

- 15 a) on prépare tout d'abord la membrane essentiellement compacte collagénique, soit par séchage d'un premier gel collagénique, de préférence par séchage à l'air ou à l'aide d'un fluide gazeux, soit par compression d'une éponge collagénique obtenue par congélation-lyophilisation d'un gel collagénique ;

b) on prépare séparément un deuxième gel collagénique ;

- 20 c) soit on dépose la membrane essentiellement compacte sur le deuxième gel collagénique, soit on verse le deuxième gel collagénique sur la membrane essentiellement compacte ; et

d) on procède enfin à une congélation-lyophilisation de l'ensemble pour obtenir ledit produit composite.

- 25 Selon une variante avantageuse de ce procédé, celui-ci est caractérisé en ce qu'on réalise une compression de l'éponge collagénique servant à préparer la membrane compacte à une pression au moins égale à 50 bars (d'environ $50 \cdot 10^5$ Pa), de préférence comprise entre 50 bars ($50 \cdot 10^5$ Pa) et 200 bars ($200 \cdot 10^5$ Pa).

- 30 Avantageusement l'étape de compression a lieu à une température comprise entre 20 à 80°C, encore de préférence entre 40°C et 60°C.

- 35 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ce procédé, celui-ci est caractérisé en ce qu'on utilise pour la préparation de l'éponge collagénique et/ou du film collagénique et/ou de la membrane collagénique, soit du collagène, soit un mélange de collagène avec un polysaccharide, en particulier un glycosaminoglycane, le chitosane, les dérivés du chitosane, la cellulose et les

dérivés de la cellulose, le dextrane et ses dérivés, un alginat, un dérivé d'un alginat, un carraghénane.

Selon une autre variante de réalisation, le procédé est caractérisé en ce qu'on réalise une réticulation d'au moins l'une des deux couches ou des deux.

5 Selon une variante de réalisation avantageuse, la réticulation précitée est une réticulation physique, en particulier une déshydratation thermique à chaud sous vide ou DHT, ou une réticulation chimique, en particulier au diphénylphosphorylazide ou DPPA, avec une aldéhyde telle que glutaraldéhyde, au carbodiimide, ou au succinimide.

10 Selon une autre variante de réalisation avantageuse de ce procédé, celui-ci est caractérisé en ce qu'on ajoute lors de la fabrication un composé favorisant le développement cellulaire, en particulier un facteur de croissance, en particulier une cytokine, une chimiokine.

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce qu'on prévoit une étape d'introduction de cellules vivantes, normales ou modifiées génétiquement, ou malignes dans au moins une des deux couches.

20 Selon une variante de réalisation avantageuse, lesdites cellules vivantes sont choisies parmi le groupe consistant de fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, en particulier macrophages ou lymphocytes, des chondrocytes, cellules osseuses en particulier ostéoblastes, cellules de Merkel d'origine sanguine, des sébocytes, des adipocytes, des cellules nerveuses.

25 Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, le procédé est caractérisé en ce qu'on introduit des fibroblastes dans la couche poreuse.

30 Selon un mode de réalisation encore préféré de l'invention, le procédé est caractérisé en ce qu'on dépose des cellules vivantes à la surface de la membrane compacte, en particulier choisies parmi des kératinocytes, des mélanocytes, des cellules de Merkel d'origine sanguine, des cellules de langerhans d'origine sanguine, des sébocytes, des cellules d'origine sanguine, des cellules nerveuses.

35 Selon une variante de réalisation de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que les cellules vivantes sont apportées soit par culture

séquentielle, soit par culture concomitante entre les différents types de cellules, ces cellules provenant de culture ou de biopsie.

Selon un troisième aspect, la présente invention couvre aussi l'utilisation du produit composite formant un support collagénique tel que
5 précédemment défini, ou tel qu'obtenu par le procédé tel que précédemment défini, ou tel que résultant de la description suivante notamment faite en relation avec les exemples pour lesquels toute caractéristique, qui apparaît être nouvelle par rapport à un état de la technique quelconque, est revendiquée en tant que telle dans sa fonction et dans sa généralité, pour la fabrication de peaux artificielles
10 destinées notamment à réaliser des essais in vitro d'efficacité de substance potentiellement active, ou à reconstruire in vivo des zones de peau endommagées.

Selon une caractéristique avantageuse, les peaux artificielles peuvent être obtenues soit sensiblement exclusivement à partir de cellules jeunes, soit sensiblement exclusivement à partir de cellules âgées, en particulier pour étudier
15 le processus de vieillissement tissulaire et en particulier cutané et éventuellement tester l'efficacité de principes actifs sur ce processus.

On comprend ainsi que l'invention permet de résoudre les problèmes techniques précités.

Dans le but d'obtenir les matériaux collagéniques les plus résistants,
20 les inventeurs ont plus particulièrement mis en œuvre le procédé décrit dans le brevet US 5 331 092 délivré le 19 juillet 1994. Cette technique permet d'obtenir un mélange de collagènes de type I et de type III solubles et insolubles natifs, très résistants aussi bien sur le plan mécanique que vis-à-vis de la digestion enzymatique. Ces deux dernières caractéristiques pourront être éventuellement
25 renforcées par toute technique de réticulation ou par adjonction de substances ayant de fortes interactions avec le collagène et ne présentant pas de toxicité vis-à-vis des cellules. De plus, ce procédé d'obtention du collagène permet de rendre presque inexistant le risque de contamination biologique due aux bactéries, virus ou prions.

30 Pour le cas des supports destinés à l'obtention des peaux reconstruites, les inventeurs ont eu l'idée de préparer des matériaux bicouches en réalisant d'abord la couche la plus compacte et ensuite l'éponge poreuse. Cette méthodologie a l'avantage de conduire à l'obtention d'une couche de surface beaucoup plus compacte que toutes celles qui avaient été décrites jusqu'à
35 maintenant. En particulier, de ce fait, des éponges compactées par de fortes compressions ou des films peuvent être ainsi fixés sur des matrices poreuses.

L'utilisation des supports décrits plus haut pour des applications d'ingénierie tissulaire implique l'ensemencement des cellules vivantes ou génétiquement modifiées, le développement des cellules pouvant se faire soit à l'intérieur du support collagénique soit à sa surface.

5 Les tissus vivants reconstruits ainsi obtenus peuvent être utilisés dans de nombreuses applications cosmétique, dermopharmaceutique ou pharmaceutique en tant que :

. modèles « in vitro » permettant de simuler les effets des ingrédients sur les métabolismes cellulaires afin d'évaluer l'efficacité et la toxicité de matières premières ou de formulations plus complexes ;

10 . tissus reconstruits capables de pallier les déficiences de tissus endommagés : peaux, cartilages, os, tendons, cornées ;

. implants vivants renfermant des cellules modifiées capables de pallier certaines déficiences de l'organisme, en particulier dans le domaine de la

15 thérapie génique.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative, qui va suivre, faite en référence à divers exemples de réalisation de l'invention donnés simplement à titre d'illustration, et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de

20 l'invention. Comme précédemment indiqué, dans les exemples, toute caractéristique, qui apparaît nouvelle par rapport à un état de la technique quelconque, est revendiquée dans sa fonction et dans sa généralité, indépendamment du contexte de l'exemple. En outre, les exemples 6 à 13 constituent des modes de réalisation actuellement préférés des produits

25 composites selon l'invention formant support collagénique. L'exemple 14 vise des essais comparatifs démontrant l'intérêt des produits composites selon l'invention comme support collagénique pour la fabrication de peaux artificielles destinées notamment à réaliser des essais in vitro d'efficacité de substance potentiellement active, ou à reconstruire in vivo des zones de peau endommagées.

30 Dans les exemples, la température est donnée en degré Celsius, la pression est la pression atmosphérique, et les pourcentages sont donnés en poids sauf indication contraire.

Les exemples 16 à 24 constituent des exemples de préparation de support à base de collagène d'origine aquatique utilisable pour la préparation de

35 peaux reconstruites, les exemples 25 à 27 sont relatifs à des essais notamment comparatifs, utilisant le collagène d'origine aquatique sous les formes préparées

dans certains des exemples 16 à 24, comparés à du collagène d'origine bovine, permettant la fabrication de peaux artificielles.

Dans les figures annexées :

5 - la figure 1 représente une vue en coupe, après marquage par coloration histologique classique, d'un produit composite selon la présente invention réalisé à partir d'une couche poreuse inférieure de collagène bovin, surfacée sur la face supérieure d'une membrane supérieure essentiellement compacte collagénique réalisée par un film collagénique préparé par séchage à l'air d'un gel de collagène, dans les conditions de l'exemple 6,

10 - la figure 2 représente une coupe similaire obtenue avec une simple matrice poreuse préparée avec le même gel de collagène bovin, mais non surfacée, c'est-à-dire dans les conditions de l'exemple 1, montrant la présence d'inclusion de kératinocytes en profondeur, non limitée à la surface,

15 - la figure 3 représente la quantité de laminines présentes dans les milieux d'incubation de peaux reconstruites, respectivement, de peaux reconstruites jeunes, obtenues à partir de cellules prélevées sur des donneurs de 25 à 35 ans ; et de peaux reconstruites matures ou âgées, obtenues à partir de cellules prélevées sur des donneurs de plus de 55 ans, afin de montrer l'influence de l'âge des donneurs, les résultats étant exprimés sous forme de "bâton", la quantité de laminines produites étant exprimée en ordonnées en pourcentage du témoin (PRJ = peaux reconstruites jeunes),

20 - la figure 4 représente l'effet inducteur d'un extrait de malt fermenté commercialement disponible sous la marque BASALINE®, COLETICA, France sur la production de laminines dans des peaux reconstruites matures, la quantité de laminines produites étant également exprimée en pourcentage du témoin,

25 - la figure 5 représente l'effet compensateur du même extrait de malt fermenté ou BASALINE®, avec en ordonnées la quantité de laminines produites en pourcentage du témoin,

30 - la figure 6 représente la prolifération des fibroblastes humains normaux en derme équivalent, avec le temps exprimé en jour et en abscisse et la densité optique x 1000 en ordonnées avec des unités augmentant de 100 ; la courbe avec les losanges est celle qui est obtenue en utilisant comme support une matrice poreuse de collagène aquatique, ici de poissons, et la courbe avec des carrés est obtenue avec du collagène bovin ; et

35 - la figure 7 représente une courbe de prolifération similaire de fibroblastes en derme équivalent avec en abscisse le temps exprimé en jour et en

ordonnées la fluorescence exprimée en unité internationale, commençant à 15.000 avec des unités augmentant de 10.000 ; la courbe avec les losanges pleins représente la fluorescence obtenue dans le cadre de l'essai 1 ; la courbe avec le carré celle obtenue avec l'essai 2 ; la courbe avec les triangles vides étant obtenue avec l'essai 3 et enfin la courbe avec les croix étant celle obtenue avec l'essai 4.

EXEMPLE 1

Préparation d'une matrice poreuse de collagène natif selon la technique du brevet US N°5331092

10

A - Obtention du collagène natif

Un gel est préparé à partir de peaux de veaux préalablement lavées (2 heures) puis épilées par un mélange de chaux-sulfure (chaux : 3.5 %, sulfure de sodium : 2.5 %) à raison de 400g de peau (matière sèche : environ 30 %) pour 250 ml d'eau. Ce bain s'effectue sous une rotation de 4 t/mn pendant 30 minutes.

15

La durée totale de la dépilation est de 36 heures.

20

Les peaux sont ensuite déchaulées dans un bain contenant du chlorure d'ammonium (3 %) et du métabisulfite de sodium (0.5 %), à raison de 400 g de peau pour 50 ml de bain.

La durée totale de ce bain est de 2 heures et trente minutes.

Les sels sont éliminés par deux lavages successifs à l'eau (15 minutes par lavage), à raison de 200 ml d'eau pour 100 g de tissu.

25

Des peaux sont alors broyées, puis lavées, sous agitation pendant 1 heure, par du tampon phosphate pH 7.8 (dihydrogénophosphate de potassium 0.78g/l et monohydrogénophosphate disodique 21.7 g/l), à raison de 5 l de tampon/1 kg de broyat. Le phosphate est ensuite éliminé par deux lavages successifs à l'eau permutée, puis par une centrifugation en continu à 4000 rpm (décanteuse Rousselet), à raison de 5l d'eau pour 1 kg de broyat.

30

Le broyat est alors acidifié par une solution d'acide acétique à 10 %, la quantité d'acide acétique étant de 5 % par rapport au collagène, la molarité finale est d'environ 0.08 M.

Le broyat est alors malaxé pendant une heure afin d'obtenir une pâte.

35

Le gel est obtenu par passage en continu de la pâte dans un appareil de traitement aux ultra sons de type UTL T/-6. Ce gel a une concentration

comprise entre 0.7 et 2 % en collagène, la proportion de collagène acido-soluble variant de 10 à 20 %, par rapport au collagène insoluble.

B - Préparation de la matrice poreuse grâce au gel de collagène obtenu comme indiqué précédemment

20 g de gel de collagène par cm^2 (matière sèche = 0.75 %) sont placés dans un plateau de lyophilisation et lyophilisés : la congélation s'effectue à -30°C puis le chauffage à $+32^\circ\text{C}$. La lyophilisation dure au total 16 heures sous une pression de 400 microbars.

Le lyophilisat est réticulé par réticulation physique (DHT) : le lyophilisat est placé 10 heures dans une étuve à 110°C et 400 microbars de pression.

EXEMPLE 2

Préparation d'une matrice poreuse réticulée grâce au diphénylphosphorylazide (DPPA) selon la technique décrite dans le brevet européen N° 466 829 du 24 juillet 1996

Le lyophilisat de collagène est incubé 24 h dans une solution renfermant 5 à 250 μl de DPPA/g de collagène contenu dans 100 ml de diméthylformamide (DMF). Le collagène est ensuite débarrassé du DPPA par rinçage dans 100 ml de DMF. Le DMF est ensuite éliminé par rinçage dans 100 ml d'une solution de tampon borate pH 8.9 (tétraborate de sodium 0.04 M, acide borique 0.04 M).

Le collagène est finalement incubé pour une nuit dans le même tampon borate. Enfin le tampon borate est éliminé par rinçage à l'eau permutée en continu pendant 6 h.

EXEMPLE 3

Préparation d'une matrice poreuse réticulée par le carbodiimide et le N-hydroxysuccinimide

Le collagène est réticulé avec de l'EDC (Ethyl dimethyl amino-propyl carbodiimide) à la concentration de 0.23 à 0.69 g/g de collagène, et avec de NHS (N-hydroxysuccinimide) à la concentration de 0 à 0.42 g/g de collagène.

Après rinçage à l'eau permutée, le collagène est à nouveau lyophilisé.

EXEMPLE 4

Préparation d'une matrice poreuse réticulée par le glutaraldéhyde

Le collagène est réticulé pendant 24 à 96 h dans une solution contenant 0.6 à 1 % de GTA à 20°C.

5 Après rinçage avec l'eau permutée, le collagène est à nouveau lyophilisé.

EXEMPLE 5

Matrice poreuse préparée avec le collagène natif de l'exemple 1 en association avec du chitosane et un glycosaminoglycane comme décrit dans le brevet européen du 29 mai 1991 N° 296078.

10 A 600 g de gel à 1.5 % de collagène, sont ajoutés 2.5 g de chitosane dissous dans 356 ml d'eau et 1.9 ml d'acide acétique, puis une solution renfermant 1 g de chondroïtine 4 sulfate contenu dans 400 ml d'eau permutée. Le mélange dont le pH est d'environ 4.0 est ensuite agité puis lyophilisé.

15 L'éponge obtenue est réticulée par DHT.

EXEMPLE 6

Matrice poreuse décrite dans l'exemple 1 surfacée avec un film de collagène

20 **A - Préparation du film**

Le gel de collagène dont la matière sèche est comprise entre 0.3 et 0.8 % est séché dans une étuve à 30° C ou sous hotte à raison de 0.5 g de gel/cm² de plateau.

Dans le gel de collagène il est possible d'ajouter de 10 à 40 % de glycérol.

25 Le collagène séché dans ces conditions forme un film transparent.

B - Association du film avec la matrice poreuse décrite plus haut

0.5 g de gel de collagène en matière sèche, sont disposés par cm² dans un plateau de lyophilisation, puis le film de collagène est déposé sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé.

30 Le lyophilisat obtenu est réticulé par DHT.

EXEMPLE 7

Matrice poreuse préparée avec un gel de collagène acido-soluble surfacée avec un film de collagène

- 5 Le procédé est celui indiqué dans l'exemple 6, la seule différence étant constituée par la nature du gel coulé sur le film qui est constitué de collagène acido-soluble préparé selon une technique bien connue de l'homme de l'art.

EXEMPLE 8

- 10 Matrice poreuse préparée avec un gel d'atélocollagène ou surfacée avec un film de collagène

- 15 Le procédé est celui indiqué dans l'exemple 6, la seule différence étant constituée par la nature du gel coulé sur le film qui est constitué d'atélocollagène c'est-à-dire de collagène sans telopeptide préparé selon une technique bien connue de l'homme de l'art.

EXEMPLE 9

Matrice poreuse constituée de collagène associé avec du chitosane et un glycosaminoglycane surfacée avec un film de collagène.

- 20 Le procédé est celui indiqué dans l'exemple 6, mais dans ce cas, le gel coulé sur le film du collagène est constitué de collagène, de chitosane, d'un glycosaminoglycane. La préparation de ce gel est décrite dans l'exemple 5.

EXEMPLE 10

- 25 Toutes les matrices poreuses surfacées avec un film de collagène décrites précédemment peuvent être réticulées selon les techniques décrites dans les exemples 2, 3 et 4.

EXEMPLE 11

- 30 Matrice poreuse en collagène seul décrite dans l'exemple 1 surfacée avec une éponge de collagène comprimée.

A - Préparation de l'éponge comprimée

- 35 Le gel de collagène préparé comme dans l'exemple 1 et ayant une matière sèche comprise entre 0.3 et 1.5 % est lyophilisé de façon à obtenir une éponge ayant un poids compris entre 0.5 et 2 g/cm².

Le lyophilisat est comprimé pendant 5 à 60 secondes, à une température comprise entre 20 et 60° C et une pression située entre 50 et 200 bars (50 à 200.10⁵ Pa).

B - Association de l'éponge comprimée avec la matrice poreuse

5 Le gel de collagène décrit dans l'exemple 1 est déposé à raison de 0.5 g par cm² dans un plateau de lyophilisation. L'éponge comprimée est alors déposée sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé. Une éponge poreuse de collagène surfacée avec une éponge comprimée de collagène est ainsi obtenue. L'ensemble est réticulé par DHT comme décrit dans l'exemple 1.

10

EXEMPLE 12

Matrice poreuse constituée de collagène, de chitosane et de glycosaminoglycane telle que décrite dans l'exemple 5 et surfacée avec l'éponge comprimée.

15 Le gel de collagène, de chitosane et de glycosaminoglycane, préparé selon le procédé de l'exemple 5 est déposé à raison de 0.5 g par cm² dans un plateau de lyophilisation, puis l'éponge comprimée est déposée sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé. Le lyophilisat est alors réticulé par DHT comme décrit dans l'exemple 1.

20 **EXEMPLE 13**

Toutes les matrices poreuses surfacées avec une éponge de collagène comprimée décrites plus haut peuvent être réticulées selon les techniques décrites dans les exemples 2, 3 et 4.

25 **EXEMPLE 14**

Peaux reconstruites préparées respectivement soit à l'aide de la matrice poreuse réticulée par le DPPA décrite dans l'exemple 2, soit grâce à la matrice poreuse, réticulée par le DPPA, de l'exemple 2, surfacée par une éponge de collagène comprimée dont l'ensemble est réticulé par le DPPA, selon l'exemple 13, afin
30 d'effectuer une comparaison entre un produit composite comprenant une couche poreuse collagénique surfacée par une membrane essentiellement compacte selon l'invention et un produit comprenant une couche poreuse collagénique seule non surfacée.

1°. Préparation des peaux reconstruites

a) Culture des fibroblaste humains normaux

On utilise des fibroblastes humains normaux résultant de prélèvements effectués indifféremment sur des sujets âgés ou jeunes, que l'on récupère et que l'on développe de manière classique pour l'homme de l'art pour les récupérer entre le sixième et le dixième passage.

On réalise un ensemencement à 250 000 cellules par cm² de matrice poreuse, respectivement soit le produit de comparaison comprenant seulement la matrice poreuse réticulée par le DPPA de l'exemple 2, soit le produit composite selon l'invention comprenant la matrice poreuse réticulée par le DPPA de l'exemple 2, surfacée par une éponge de collagène comprimée dont l'ensemble est réticulé par le DPPA, selon l'exemple 13.

Le milieu de culture est composé de DMEM/HAM F12 50/50 (v/v) additionné à 10 % en poids de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline, 25 µg/ml de gentamycine, 1 µg/ml d'amphotéricine B, 50 µg/ml de vitamine C.

On réalise une culture pendant trois semaines en changeant le milieu trois fois par semaine.

b) Culture de kératinocytes humains normaux

On réalise ensuite la culture de kératinocytes humains normaux obtenus indifféremment sur des sujets jeunes ou âgés, que l'on récupère et cultive pour les prélever entre le premier et le troisième passage, selon les techniques de cultures bien connues de l'homme de l'art.

On réalise un ensemencement à 250 000 cellules par cm² de surface, soit de la surface de la matrice poreuse réticulée par le DPPA de l'exemple 2 ; soit du produit composite selon l'invention comprenant la matrice poreuse réticulée par le DPPA de l'exemple 2, surfacée par une éponge de collagène comprimée dont l'ensemble est réticulé par le DPPA, selon l'exemple 13 et, dans ce cas, l'ensemencement des kératinocytes a lieu sur la surface de la membrane essentiellement compacte de collagène.

La culture de ces produits comprenant à la fois un ensemencement de fibroblastes et de kératinocytes a lieu dans un milieu de Green composé de :

DMEM additionné de :

30 % HAM F12,

10 % de sérum de veau foetal,

100 UI/ml de pénicilline,

100 µg/ml de streptomycine,
1 µg/ml d'amphotéricine B,
2 µmol/ml de L-glutamine,
EGF (Epidermal Growth factor) 10 ng/ml,
5 insuline disponible dans le commerce sous la marque UMULINE®
0,12 UI/ml,
hydrocortisone 400 ng/ml,
toxine cholérique 10^{-12} mol/ml,
transferrine 5 µg/ml,
10 triodothyronine à raison de $2 \cdot 10^{-9}$ M,
adenine $1,8 \cdot 10^{-7}$ mol/ml,
vitamine C 50 µg/ml.
On réalise cette culture pendant une semaine en changeant les milieux
tous les jours.

15

**c) Culture du produit composite selon l'invention et de la couche poreuse non
surfacée de comparaison**

Après avoir réalisé la culture de l'étape b) pendant une semaine en
changeant de milieux tous les jours, on émerge à l'interface air-liquide la couche
20 de surface contenant les kératinocytes, alors que la couche contenant les
fibroblastes reste immergée, suivi d'une culture pendant trois semaines dans du
milieu d'émersion composé de :

DMEM additionné de :
10 % de sérum de veau foetal,
25 100 UI/ml de pénicilline,
100 µg/ml de streptomycine,
1 µg/ml d'amphotéricine B,
2 µmol/ml de L-glutamine,
EGF 10 ng/ml,
30 insuline de marque UMULINE® 0,12 UI/ml,
hydrocortisone 400 ng/ml,
vitamine C 50 µg/ml.

Après 7 semaines de culture au total résultant des étapes a) à c), on
35 obtient une peau reconstruite composée d'un derme reconstruit, les fibroblastes

ayant colonisé la matrice tridimensionnelle collagénique, recouvert par un épiderme pluristratifié.

A l'interface dermo-épidermique, on note la présence d'une membrane basale où l'on peut mettre en évidence la présence de laminine de type I, de laminine de type 5, de collagène de type IV et de type VII par immunomarquage.

Ainsi, le surfaçage des matrices poreuses par une couche essentiellement compacte pour obtenir un produit composite selon l'invention permet d'obtenir, après trois semaines de préparation du derme équivalent, une plus grande quantité de fibroblastes en surface des matrices collagéniques avant l'épidermisation.

Dans le cas d'une matrice poreuse seule, c'est-à-dire non surfacée, si la couche superficielle de fibroblastes n'est pas complètement jointive, des kératinocytes peuvent s'infiltrer dans le derme équivalent sous-jacent et former des îlots kératinocytaires, traits caractéristiques totalement anormaux.

On constate ainsi que grâce à l'invention, qui utilise des couches plus compactes que celles qui pouvaient avoir été utilisées auparavant dans l'art antérieur, on obtient une meilleure sécurité contre la pénétration des kératinocytes.

On notera dans la description que l'abréviation DMEM signifie Dulbecco's Modified Eagle Medium.

EXEMPLE 15

Etude comparative respectivement de peaux reconstruites à partir de cellules de donneurs jeunes et de peaux reconstruites à partir de cellules de donneurs âgés, avec les produits composites selon la présente invention pour mesurer l'efficacité de principes actifs sur la production de laminines.

Dans cet exemple, on procède essentiellement comme décrit à l'exemple 14 concernant les cultures en utilisant le même produit composite selon la présente invention comprenant une couche ou matrice poreuse collagénique réticulée par le DPPA décrite dans l'exemple 2, surfacée par une éponge de collagène comprimée, dont l'ensemble est réticulé par le DPPA, selon l'exemple 13, en procédant comme suit :

Préparation des peaux reconstruites

1) On a préparé respectivement des peaux reconstruites jeunes en procédant comme décrit à l'exemple 14, si ce n'est que les cellules respectivement de fibroblastes et de kératinocytes étaient issues de donneurs jeunes, c'est-à-dire

ayant un âge compris entre 25 et 35 ans, et d'autre part des peaux reconstruites âgées ou matures obtenues par l'emploi de cellules de fibroblastes ou de kératinocytes issues de donneurs âgés, dont l'âge est de plus de 55 ans.

5 **a) Matériel et méthode**

Comme indiqué à l'exemple 14, étape a, on a tout d'abord réalisé l'ensemencement de matrices poreuses du produit composite de l'invention avec des fibroblastes dermiques humains normaux issus soit de pools de cellules jeunes, soit de pools de cellules matures ou âgées, et on réalise une culture
10 pendant 21 jours dans les conditions décrites à l'exemple 14 étape a.

b) Après les 21 jours de culture précédents, des feuillets épidermiques préparés séparément à partir des kératinocytes issus soit de pools de cellules jeunes, soit de pools de cellules matures sont ensemencés sur la surface de la membrane
15 essentiellement compacte de collagène du produit composite.

On réalise une culture pendant 14 jours dans les conditions décrites à l'exemple 14b.

2) Quantification des laminines

20 Après les 14 jours de cultures de l'ensemble fibroblaste-kératinocyte, les laminines contenues dans les milieux d'incubation des peaux reconstruites respectivement jeunes ou matures, ainsi obtenues sont quantifiées à l'aide d'un kit de dosage ELISA commercialement disponible (Takara, Japon).

Ces résultats sont rapportés à la figure 3.

25 La figure 3 montre que les peaux reconstruites matures contiennent environ deux fois moins de laminines que les peaux reconstruites jeunes (PRJ) servant de témoin à 100 %.

30 **3) Mesure de l'effet inducteur d'un principe actif, tel qu'un extrait de malt fermenté commercialisé sous la marque BASALINE® par COLETICA, sur la production de laminines dans des peaux reconstruites jeunes et matures**

Dans cet essai comparatif, on procède comme décrit ci-dessus, si ce n'est que pour les 14 jours de culture avec les kératinocytes, les peaux
35 reconstituées jeunes ou matures sont maintenues en culture pendant 14 jours soit en l'absence (contrôle), soit en présence de 0,5 % en poids d'extraits de malt

fermentés commercialement disponibles sous la marque BASALINE[®], COLETICA, France.

A la fin de la période d'incubation, comme dans l'exemple ci-dessus, les laminines contenues dans les milieux d'incubation étaient quantifiées par dosage ELISA.

Les résultats sont rapportés à la figure 4.

La tension à 100 % est constituée par le taux de laminines dans la Peau Reconstituées Agée ou PRA.

La figure 4 montre que le principe actif extrait de malt fermenté, ou BASALINE[®], était capable de stimuler la production des laminines dans des peaux reconstituées matures. Dans les mêmes conditions, le principe actif extrait de malt fermenté ou BASALINE[®] ne modifie pas de façon significative la production des laminines dans des peaux reconstituées jeunes, indiquée à la figure 5.

On constate ainsi que le principe actif extrait de malt fermenté ou BASALINE[®] augmente de 65 % la production de laminines de peaux reconstituées matures.

De même, ce principe actif n'affecte pas les processus physiologiques impliqués dans la régulation de la production de laminines de peaux reconstituées jeunes.

Ces expériences ont permis d'évaluer la magnitude de l'effet compensateur de l'extrait de malt fermenté ou BASALINE[®] défini comme la capacité de ce principe actif à réduire l'écart observé entre les productions de laminines de peaux constituées jeunes relativement aux peaux reconstituées matures.

La figure 5 montre que la différence entre les productions de laminines de peaux reconstituées jeunes et de peaux reconstituées matures peut être réduite de 65 % par le principe actif, utilisé à 0,5 %.

EXEMPLE 16

Préparation d'une matrice poreuse en collagène natif aquatique

Le collagène étant obtenu selon la technique du brevet US 5331092 accordé le 19 juillet 1994

A - Obtention du collagène natif aquatique

Un gel de collagène est préparé à partir de peaux ventrales de sole broyées puis lavées avec un tampon phosphate pH 7.8 dont la composition est : 0.78 g/l de dihydrogénophosphate de potassium et 21.7 g/l de monohydrogénophosphate disodique. Le lavage s'effectue sous agitation pendant une heure à raison de 5 l de tampon pour 1 kg de broyat. Le phosphate est ensuite éliminé par deux lavages successifs à l'eau permutee, puis par une centrifugation en continu à 4000 t/mn (décanteur Rousselet), à raison de 5 l d'eau pour 1 kg de broyat.

Le broyat est alors acidifié par une solution d'acide acétique 0.25 M à raison de 1 kg de broyat pour 10 l de solution. Le gel est alors centrifugé à 4000 t/mn pendant 5mn.

Le gel qui sera utilisé est constitué par le surnageant obtenu dont la concentration en collagène est comprise entre 0.5 et 2 %.

B - Préparation de la matrice poreuse à partir du gel de collagène obtenu précédemment

Ce gel est coulé dans un plateau de lyophilisation à raison de 20 g/cm². Il est alors lyophilisé après congélation à -30° C et chauffage à + 32° C. La lyophilisation dure au total 16 heures sous une pression de 400 microbars. La matrice obtenue est alors réticulée par déshydratation hydrothermique (DHT). Celle-ci consiste en un chauffage dans une étuve à 110° C sous un vide de 400 microbars pendant 16 heures.

25 EXEMPLE 17

Préparation d'une matrice poreuse réticulée grâce au diphénylphosphorylazide (DPPA) selon la technique décrite dans le brevet européen N° 466 829 du 24 juillet 1996

La matrice de collagène de l'exemple 16 est incubée 24 h dans une solution renfermant 5 à 250 µl de DPPA/g de collagène contenu dans 100 ml de diméthylformamide (DMF). Le collagène est ensuite débarrassé du DPPA par rinçage dans 100 ml de DMF. Le DMF est ensuite éliminé par rinçage dans 100 ml d'une solution de tampon borate pH 8.9 (tétraborate de sodium 0.04 M, acide borique 0.04 M).

Le collagène est finalement incubé pour une nuit dans le même tampon boraté. Enfin le tampon borate est éliminé par rinçage à l'eau permutée en continu pendant 6 h.

5 **EXEMPLE 18**

Préparation d'une matrice poreuse réticulée par le carbodiimide et le N-hydroxysuccinimide

10 La matrice de collagène aquatique de l'exemple 16 est réticulée avec de l'EDC (Ethyl diméthylaminopropyl carbodiimide) à la concentration de 0.23 à 0.69 g/g de collagène, et avec du NHS (N-hydroxysuccinimide) à la concentration de 0.42 g/g de collagène.
Après rinçage à l'eau permutée, le collagène est à nouveau lyophilisé.

EXEMPLE 19

15 Préparation d'une matrice poreuse réticulée par le glutaraldéhyde

La matrice poreuse de collagène aquatique de l'exemple 16 est réticulée pendant 24 à 96 h dans une solution contenant 0.6 à 1 % de GTA à 20°C.
Après rinçage avec l'eau permutée, le collagène est à nouveau lyophilisé.

20 **EXEMPLE 20**

Matrice poreuse préparée avec le collagène natif aquatique de l'exemple 16 en association avec du chitosane et un glycosaminoglycane comme décrit dans le brevet européen du 29 mai 1991 N° 296078

25 A 600 g de gel à 1.5 % de collagène, sont ajoutés 2.5 g de chitosane dissous dans 356 ml d'eau et 1.9 ml d'acide acétique, puis une solution renfermant 1 g de chondroïtine 4 sulfate contenu dans 400 ml d'eau permutée. Le mélange dont le pH est d'environ 4.0 est ensuite agité puis lyophilisé.
L'éponge obtenue est réticulée par DHT.

30

EXEMPLE 21

Matrice poreuse décrite dans l'exemple 16 surfacée avec un film de collagène

A - Préparation du film

5

Le gel de collagène dont la matière sèche est comprise entre 0.3 et 0.8 % est séché dans une étuve à 30° C ou sous hotte à raison de 0.5 g de gel/cm² de plateau.

Dans le gel de collagène il est possible d'ajouter de 10 à 40 % de glycérol.

10

Le collagène séché dans ces conditions forme un film transparent.

B - Association du film avec la matrice poreuse décrite plus haut

15

Le gel de collagène aquatique natif de 0.5% à 2% en matière sèche, est déposé à raison de 0.5g par cm² dans un plateau de lyophilisation, puis le film de collagène est déposé sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé.

Le lyophilisat obtenu est réticulé par DHT.

EXEMPLE 22

20

Matrice poreuse en collagène seul décrite dans l'exemple 16 surfacée avec une éponge de collagène comprimée.

A - Préparation de l'éponge comprimée

25

Le gel de collagène préparé comme dans l'exemple 16 et ayant une matière sèche comprise entre 0.3 et 1.5 % est lyophilisé de façon à obtenir une éponge ayant un poids compris entre 0.5 et 2 g/cm².

Le lyophilisat est comprimé pendant 5 à 60 secondes, à une température comprise entre 20 et 60° C et une pression située entre 50 et 200 bars (50 à 200.10⁵ Pa).

30

B - Association de l'éponge comprimée avec la matrice poreuse

35

Le gel de collagène décrit dans l'exemple 16 est déposé à raison de 0.5 g par cm² dans un plateau de lyophilisation. L'éponge comprimée est alors déposée sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé. Une éponge poreuse de

collagène surfacée avec une éponge comprimée de collagène est ainsi obtenue. L'ensemble est réticulé par DHT comme décrit dans l'exemple 16.

EXEMPLE 23

- 5 Matrice poreuse constituée de collagène, de chitosane et de glycosaminoglycane telle que décrite dans l'exemple 20 et surfacée avec l'éponge comprimée.

Le gel de collagène, de chitosane et de glycosaminoglycane, préparé selon le procédé de l'exemple 20 est déposé à raison de 0.5 g par cm² dans un plateau de lyophilisation, puis l'éponge comprimée est déposée sur ce gel et
10 l'ensemble est lyophilisé. Le lyophilisat est alors réticulé par DHT comme décrit dans l'exemple 16.

EXEMPLE 24

- Toutes les matrices poreuses surfacées avec une éponge de collagène comprimée
15 décrites plus haut peuvent être réticulées selon les techniques décrites dans les exemples 17, 18 et 19.

EXEMPLES 25 A 27 : Essais de comparaison du métabolisme cellulaire entre les matrices collagéniques bovines et aquatiques

20

EXEMPLE 25 : ESSAI DE VIABILITE CELLULAIRE DE FIBROBLASTE

I - Préparation des dermes équivalents

Pour cet essai de comparaison, on fabrique d'une part une matrice poreuse aquatique réticulée au DPPA, selon l'exemple 17.

- 25 A titre de comparaison, une fabrique une matrice poreuse comparative avec du collagène d'origine bovine, dite matrice bovine, également réticulée au DPPA, dans les mêmes conditions que celles de l'exemple 17.

On prend des fibroblastes humains normaux issus d'un pool de donneurs jeunes utilisé au 7^{ème} passage et que l'onensemence dans chacune des
30 matrices aquatique et bovine, à raison de 250 000 cellules par cm² dans le cas de l'étude de prolifération et de synthèse protéique, et que l'onensemence à raison de 300 000 cellules par cm² pour les matrices aquatique et bovine destinées aux études d'histologie.

- On effectue la culture de ces matrices respectivement aquatique et
35 bovine dans du milieu composé de DMEM/HAM F 12 dans un rapport 50/50 (v/v)

additionné de 10 % de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline, 25 µg/ml de gentamycine, 1 µg/ml d'amphotéricine B, 50 µg/ml de vitamine C.

On réalise cette culture pendant 1 mois en changeant le milieu de culture 3 fois par semaine.

5

II - Analyses réalisées

1) Mesure de la viabilité cellulaire par réaction au MTT

On ajoute 1 % en poids de MTT (c'est-à-dire le 3-(4-(diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényltétrazolium bromure) dans le milieu de culture.

10

On réalise une incubation pendant 2,5 heures à 37°C.

Après incubation pendant cette durée, la densité optique du produit de transformation (bleu formazan) est lue à 550 nm après solubilisation dans le DMSO.

15

La densité optique obtenue est proportionnelle à l'activité des succinate-déshydrogénases qui sont capables d'effectuer la transformation du sel de tétrazolium MTT jaune clair en cristaux bleus de formazan.

La viabilité cellulaire a été réalisée après 1, 5, 7, 22 jours et un mois de culture.

20

Pour déterminer les valeurs moyennes, on a réalisé 6 échantillons pour chaque matrice.

TABLEAU I
DE RESULTATS

Jours	Matrice aquatique	Déviati on au standard moyenne	Matrice bovine	Déviati on standard moyenne
1	487	24	403	40
5	604	19	393	59
7	520	56	398	64
22	608	30	680	40

25

Ces résultats font également l'objet des courbes de la figure 6 annexée.

On notera que la courbe avec les losanges est celle obtenue avec la matrice aquatique et la courbe avec les carrés est celle obtenue avec la matrice bovine.

On observe à partir des résultats que de manière totalement surprenante, la matrice aquatique non seulement constitue un support permettant la survie de fibroblastes humains normaux mais aussi la prolifération cellulaire de ces fibroblastes humains normaux, tout en constituant même un support de culture bien meilleur pendant les trois premières semaines.

Il peut donc être conclu de ces essais que le collagène aquatique est, de manière surprenante, particulièrement adapté pour réaliser un support d'ingénierie tissulaire en particulier pour des applications in vitro et même et surtout in vivo pour constituer des biomatériaux contenant des cellules vivantes et en particulier et de préférence des cellules vivantes d'êtres humains.

2) Mesure des synthèses protéiques

La synthèse des protéines sécrétées pendant 3 jours dans un milieu de culture sans sérum de veau foetal a été évaluée après un mois de maturation des dermes équivalents, tels qu'obtenus après le mois de culture dans les conditions rapportées ci-dessus dans la préparation des dermes équivalents.

Le dosage est réalisé par la méthode du microBCA de Pierce.

Parallèlement, la densité cellulaire a été évaluée par un test au MTT dans les conditions décrites ci-dessus.

La teneur en protéines relative correspond à la teneur protéique ramenée à 1 unité de densité cellulaire exprimée en densité optique ou DO, afin de raisonner à concentration cellulaire équivalente. Les résultats obtenus sont répertoriés au tableau II ci-après :

TABLEAU II
RESULTATS DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Collagène du support	Matrice aquatique		Matrice bovine	
	Moyenne	*	Moyenne	*
Densité cellulaire (DO)	2,12	0,09	1,91	0,13
Protéines (µg/ml)	494	48	499	32
Teneur en protéines relative	233	18	262	23

* : Déviation standard moyenne

Comme pour le tableau I, la moyenne résulte d'une moyenne réalisée sur 6 échantillons.

3) Histologie

5 Les dermes équivalents obtenus après culture pendant 21 jours de culture à partir des matrices en collagène aquatique et bovin sont fixés dans une solution à 2 % en paraformaldéhyde puis post-fixés dans une solution de tétroxyde d'osmium, déshydratés, inclus en Epon, coupés et observés en microscopie électronique à transmission (Jeol 1200) au CMEABG (Lyon, France).

10

Conclusions

Ces résultats indiquent une très bonne colonisation des matrices tridimensionnelles qu'elles soient aquatiques ou bovines. Après trois semaines de culture, la densité cellulaire est équivalente dans les deux types de matrices. 15 Toutefois, il semble que la matrice aquatique permette une meilleure adhésion cellulaire en début d'expérimentation comme l'indique l'étude de prolifération lors de la première semaine de culture et ainsi une meilleure colonisation pour des temps courts de culture.

En ce qui concerne les synthèses protéiques, après un mois de culture 20 les capacités de synthèse des fibroblastes (teneur en protéines relative) sont également équivalentes.

Ces résultats indiquent que les matrices de collagène aquatique mises au point ont permis la préparation de dermes équivalents de bonne qualité ; les résultats obtenus avec ces matrices étant comparables à ceux obtenus avec des 25 matrices de collagène bovin.

En microscopie électronique à transmission, les fibroblastes ont pu être observés dans les matrices d'origine bovine et aquatique. Dans les deux types de matrices, on note la présence d'une abondante matrice extracellulaire néosynthétisée. On peut différencier la matrice extracellulaire néosynthétisée 30 grâce à la striation périodique des fibres de collagène déposé comparativement aux amas collagéniques formant la matrice tridimensionnelle de l'éponge de départ.

EXEMPLE 26**Influence des différents types de réticulation des matrices collagéniques aquatiques sur la viabilité cellulaire**

5 Pour étudier l'influence des différents types de réticulation des matrices collagéniques aquatiques sur la viabilité cellulaire, on procède aux essais suivants :

I) Préparation des dermes équivalents**a) Support ou matrice utilisé**

10 On prépare divers supports ou matrices de collagène en utilisant diverses proportions de collagène dans le gel de collagène servant à fabriquer la couche ou matrice poreuse et en utilisant éventuellement un agent de réticulation différent, comme suit :

1) Essai 1

15 Pour cet essai, on fabrique une matrice poreuse sous forme d'éponge poreuse à partir d'un gel de collagène aquatique préparé à partir de 1,3 % en poids en collagène aquatique, que l'on congèle à -80°C et que l'on soumet à une lyophilisation standard conforme à l'exemple 17 et que l'on soumet ensuite à une réticulation au DPPA à une proportion de $250\text{ }\mu\text{l/g}$ d'éponge à l'état sec.

20

2) Essai 2

25 Pour cet essai, on prépare un support poreux sous forme d'éponge aquatique à partir d'un gel de collagène aquatique comprenant 0,7 % en poids de collagène aquatique, que l'on soumet à une congélation à -80°C , puis à une lyophilisation standard et une réticulation au DPPA à $250\text{ }\mu\text{l/g}$ sec comme dans l'essai 1.

3) Essai 3

30 Pour cet essai, on procède comme pour l'essai 1, si ce n'est que la réticulation a lieu avec l'EDC, selon l'exemple 18, à une proportion de $0,46\text{ g/g}$ d'éponge sèche.

4) Essai 4

35 On prépare un support poreux comprenant une éponge de collagène aquatique obtenu à partir d'un gel de collagène aquatique comprenant 1,1 % en poids de collagène aquatique, que l'on soumet à une congélation à -80°C , puis à

une lyophilisation standard et à une réticulation au DPPA à 250 μ l/g sec comme dans l'essai 2, la différence résidant dans une proportion de 1,1 % en poids de collagène aquatique.

Dans l'ensemble de ces essais, le collagène aquatique est issu, comme dans l'exemple 17, de la peau ventrale de sole.

b) Culture des fibroblastes sur ces matrices

On utilise, comme dans l'exemple 25, des fibroblastes humains normaux mais qui sont prélevés au 8^{ème} passage.

On réalise un ensemencement à raison de 275 000 cellules par cm^2 .

Le milieu culture est composé de DMEM/HAM F12 50/50 (v/v) additionné de 10 % en poids de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline, 25 μ g/ml de gentamycine, 1 μ g/ml d'amphotéricine B, 50 μ g/ml de vitamine C.

On réalise la culture pendant 1 mois en changeant de milieu 3 fois par semaine.

Pour chaque essai, on utilise 4 matrices afin d'effectuer une moyenne pour chaque type d'essai et mesurer la déviation standard moyenne.

II) Analyses réalisées

20 Mesure de la viabilité cellulaire par réaction à l'Alamar Blue (marqueur d'oxydoréduction)

L'Alamar Blue est ajouté à raison de 2 % en poids d'un milieu de culture utilisé, au moment où l'on souhaite mesurer la viabilité cellulaire sur un prélèvement réalisé sur le milieu culture.

25 Après incubation à 2 h 20 à 37°C, on lit la fluorescence, sur la base d'une excitation à 530 nm et une émission à 590 nm).

L'intensité de la fluorescence obtenue est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules.

On effectue la mesure de la viabilité cellulaire sur 10 échantillons après 1, 4 6, 11 17 jours de culture.

Les résultats sont exprimés au tableau III ci-après.

Les résultats sont indiqués en unité internationale de fluorescence en fonction du temps.

TABLEAU III
VIABILITE CELLULAIRE (u I fluorescence)

Temps (jours)	ESSAI 1		ESSAI 2		ESSAI 3		ESSAI 4	
	Moyenne	SD*	Moyenne	SD*	Moyenne	SD*	Moyenne	SD*
1	21734	1184	30535	1888	25528	6820	28461	3805
4	31611	920	35623	3544	36404	3570	45126	2930
6	43144	2500	35244	2095	37819	4170	41254	3396
11	42808	1481	38532	2537	42442	3112	44508	2329
17	45484	2426	45094	1470	43963	8285	43939	4521
Ordre	1		2		3		4	

5 * : Déviation standard

Les résultats du tableau III font aussi l'objet de la figure 7 annexée.

Ils montrent les courbes de prolifération fibroblastique en derme équivalent.

10 La courbe en losange plein est celle réalisée avec l'essai 1 ; la courbe en carré plein est celle réalisée avec l'essai 2 ; la courbe en triangle est celle réalisée avec l'essai 3 et la courbe avec les croix est celle réalisée avec l'essai 4.

Le temps est exprimé en jour en abscisse et la fluorescence en UI avec une échelle démarrant à 15 000 et augmentant par unité de 10 000 jusqu'à 55 000.

15 Les résultats permettent d'aboutir aux conclusions suivantes.

Conclusions

20 Les résultats indiquent les différentes matrices préparées peuvent permettre une bonne croissance fibroblastique après 17 jours de culture. Quelle que soit la préparation des matrices collagéniques aquatiques, les fibroblastes adhèrent bien à leur support tridimensionnel et se divisent très rapidement afin de coloniser la matrice.

25 Le profil de prolifération est très légèrement variable d'un type de matrice à l'autre mais après 17 jours de culture, la densité fibroblastique est comparable quel que soit le procédé de fabrication.

Les différents types de réticulation employés réalisés soit avec le DPPA ou avec l'EDC ne semblent pas influencer le renouvellement cellulaire.

Après pratiquement 3 semaines de culture, la stabilité des matrices est excellente, à savoir peu de digestion, peu de contraction.

EXEMPLE 27 :

5 Essai démontrant les avantages du collagène aquatique pour la mise en évidence et le dosage du collagène humain néosynthétisé

Cet essai est similaire à celui de l'exemple 25, si ce n'est que l'on effectue une histologie avec immuno-marquage.

L'essai a lieu de la manière suivante :

10

1) Préparation des dermes équivalents

Il s'agit de dermes équivalents de l'exemple 25, la culture étant réalisée dans les conditions de l'exemple 25.

15 Cette culture est donc effectuée pendant trois semaines en changeant le milieu trois fois par semaine, l'ensemencement des fibroblastes humains normaux ayant eu lieu à 300.000 cellules par cm² comme cela était indiqué dans l'exemple 25.

2) Histologie

20 a) Histologie classique

On réalise la fixation avec le paraformaldéhyde à une teneur de 4 % en poids, on réalise ensuite une déshydratation et une inclusion en paraffine.

On effectue ensuite des coupes à 7 µm et une coloration Mallory Haidenhain après déparaffinage et réhydratation.

25

b) Immunomarquage

On fixe également avec le paraformaldéhyde à 4 % en poids, on réalise une inclusion en Tissue Tek OCT compound, c'est-à-dire un liquide d'inclusion fourni par Miles, Elkhart, Indiana, USA, et une coupe à froid à 7 µm.

30 L'immunomarquage est effectué de la manière suivante :

i. Avec un premier anticorps anti-collagène de type I humain de lapin (dilution 1/40)

ii. Un deuxième anticorps anti-lapin conjugué FITC (Fluorescéine Iso ThioCyanate) (dilution 1/160)

35

Contre coloration avec DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, dilactate).

3) Résultats

On constate que les supports constitués respectivement par une matrice aquatique et une matrice bovine forment des pores plus ou moins lâches dans lesquels viennent adhérer les fibroblastes.

- 5 En surface, on note une proportion plus importante de fibroblastes formant un surfaçage favorable du derme équivalent pour la réalisation d'une peau reconstruite. La répartition des fibroblastes est homogène dans les éponges aquatique et bovine.

- 10 En immunomarquage, on constate que la matrice formée de collagène bovin est marquée par l'anticorps anti-collagène de type I humain (croisement).

Par contre, la matrice d'origine aquatique n'est que très faiblement marquée par l'anticorps anti-collagène humain.

L'utilisation des éponges composées de collagène aquatique est donc favorable à la mise en évidence de la matrice extracellulaire néosynthétisée.

- 15 Ces résultats s'expliquent par les travaux du Professeur Hartmann sur les réactions des différents antigènes par rapport aux différents anticorps déterminés par les mesures des densités optiques après immunomarquage données au tableau IV dit de Hartmann ci-après :

TABLEAU IV
Réaction croisée humain, bovin, poisson (test Elisa)

Antigènes Anticorps	Collagène I sole	Collagène I humain	Collagène I bovin
20111 (225)			
1/25	190	>	815
1/50	210	>	548
1/100	73	1233	234
1/200	43	605	136
1/400	56	326	165
50121 (03)			
1/25	180	1550	>
1/50	130	1094	>
1/100	158	536	>
1/200	96	305	967
1/400	109	215	728
50171 (01)			
1/25	1880	64	73
1/50	1043	193	32
1/100	571	51	33
1/200	523	51	87

(> : densité optique supérieure à 2000)

5

Les résultats sont exprimés en D.O. x 10^3 (densité optique à $\lambda = 450$ nm)

Légendes : 20111 (225) : anti-collagène I humain

50121 (03) : anti-collagène I bovin

10

50171 (01) : anti-collagène I poisson (sole)

De ce tableau de résultats, il ressort que quel que soit l'anticorps (anti-collagène type I humain, anti-collagène type I bovin, anti-collagène type I de sole), en immunomarquage, la différence est beaucoup plus importante entre le
 15 collagène humain et le collagène de sole qu'entre le collagène humain et le

- collagène bovin. Il en résulte que dans une matrice de collagène de poisson, le collagène synthétisé par les fibroblastes humains pourra être mis en évidence beaucoup plus aisément. Ceci confirme les résultats décrits précédemment obtenus par un immunomarquage par l'anticorps anti-collagène de type I humain du
- 5 collagène synthétisé dans la matrice de collagène de poisson, ce qui constitue un résultat particulièrement inattendu et avantageux de l'invention.

REVENDEICATIONS

1. Produit composite formant un support collagénique comprenant au moins une couche poreuse collagénique revêtue sur au moins une face d'une
5 membrane essentiellement compacte collagénique réalisée soit par un film collagénique préparé par séchage, de préférence à l'air ou dans un fluide gazeux, d'un gel de collagène, soit par une éponge collagénique très fortement comprimée.

2. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce que le produit collagénique précité est choisi parmi du collagène et un mélange de collagène
10 avec un polysaccharide, en particulier un glycosaminoglycane, chitosane, et les dérivés du chitosane, la cellulose et les dérivés de la cellulose, le dextrane et ses dérivés, un alginat, un dérivé d'un alginat, un carraghénane.

3. Produit selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'au moins une des deux couches, respectivement la couche poreuse et la membrane
15 essentiellement compacte, comprend des cellules vivantes, normales ou modifiées génétiquement, ou malignes, en particulier provenant de sujets jeunes ou âgés.

4. Produit selon la revendication 3, caractérisant à ce que les cellules vivantes sont choisies parmi le groupe consistant de fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales
20 d'origine sanguine, cellules sanguines, en particulier macrophages ou lymphocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, adipocytes, sébocytes, chondrocytes, cellules osseuses, des chondrocytes, des ostéoblastes, cellules de Merkel d'origine sanguine, normales ou génétiquement modifiées ou malignes.

5. Produit selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce qu'il contient des fibroblastes normaux génétiquement modifiés ou malins dans la couche poreuse et des cellules vivantes normales ou génétiquement modifiées ou malignes, à la surface de la membrane compacte en particulier choisies parmi des
25 kératinocytes, des mélanocytes, des cellules de Merkel d'origine sanguine, des cellules de langerhans d'origine sanguine, des sébocytes, des cellules d'origine sanguine, des cellules nerveuses.
30

6. Produit selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la compression de l'éponge collagénique comprimée est réalisée à une pression au minimum égale à environ 50 bars, équivalent à environ $50 \cdot 10^5$ Pa, de préférence
35 comprise entre 50 bars ($50 \cdot 10^5$ Pa) et 200 bars ($200 \cdot 10^5$ Pa), éventuellement cette

compression ayant lieu à une température comprise entre 20 et 80 degré C°, encore mieux entre 40 C° et 60 C°.

7. Produit selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la membrane essentiellement compacte est préparée préalablement à la
5 combinaison avec la couche poreuse, de préférence comprenant une éponge collagénique, en particulier en préparant la membrane et en la déposant sur un gel collagénique avant que l'ensemble ne soit congelé et lyophilisé pour obtenir ledit produit composite.

8. Produit selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en
10 que l'éponge collagénique est/ou le film collagénique est/ou la membrane collagénique, comprend du collagène d'origine mammifère, en particulier d'origine bovine.

9. Produit selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'éponge collagénique et/ou le film collagénique et/ou la membrane
15 collagénique, comprend du collagène d'origine marine, de préférence issu de peaux de poissons de la famille des téléostéens, plus particulièrement des poissons présentant des zones de peaux dépigmentées, encore mieux des poissons plats qui sont pêchés de façon industrielle comme par exemple la sole, la limande, le turbo, le barbue, de préférence la sole.

20 10. Produit selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'au moins l'une des deux couches est réalisée à partir d'un gel collagénique contenant un mélange de collagène soluble et de collagène insoluble, par exemple sous forme de fibres.

25 11. Produit selon la revendication 7 à 9, caractérisé en ce que le collagène est du collagène de type I et/ou de type III.

12. Procédé de fabrication d'un produit composite comprenant au moins une couche poreuse collagénique revêtue sur au moins une face d'une membrane essentiellement compacte collagénique, caractérisé en ce que :

30 a) on prépare tout d'abord la membrane essentiellement compacte collagénique, soit par séchage d'un premier gel collagénique, de préférence par séchage à l'air ou à l'aide d'un fluide gazeux, soit par compression d'une éponge collagénique obtenue par congélation- lyophilisation d'un gel collagénique ;

b) on prépare séparément un deuxième gel collagénique ;

35 c) soit on dépose la membrane essentiellement compacte sur le deuxième gel collagénique, soit on verse le deuxième gel collagénique sur la membrane essentiellement compacte ; et

d) on procède enfin à une congélation-lyophilisation de l'ensemble pour obtenir ledit produit composite.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'on réalise une compression de l'éponge collagénique servant à préparer la membrane compacte à une pression au moins égale à 50 bars ($50 \cdot 10^5$ Pa), de préférence comprise entre 50 bars ($50 \cdot 10^5$ Pa) et 200 bars ($200 \cdot 10^5$ Pa).

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'étape de compression a lieu à une température comprise entre 20 et 80°C, encore de préférence entre 40°C et 60°C.

15. Procédé selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce qu'on utilise pour la préparation de l'éponge collagénique et/ou du film collagénique et/ou de la membrane collagénique, soit du collagène, soit un mélange de collagène avec un polysaccharide, en particulier un glycosaminoglycane, le chitosane, les dérivés du chitosane, la cellulose et les dérivés de la cellulose, le dextrane et ses dérivés, un alginat, un dérivé d'un alginat, un carraghénane.

16. Procédé selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce qu'on utilise du collagène d'origine mammifère, en particulier d'origine bovine.

17. Procédé selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que l'éponge collagénique et/ou le film collagénique et/ou la membrane collagénique, comprend du collagène d'origine marine, de préférence issu de peaux de poissons de la famille des téléostéens, plus particulièrement des poissons présentant des zones de peaux dépigmentées, encore mieux des poissons plats qui sont pêchés de façon industrielle comme par exemple la sole, la limande, le turbo, le barbeau, de préférence la sole.

18. Procédé selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce qu'on réalise une réticulation d'au moins l'une des deux couches ou des deux.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la réticulation est une réticulation physique, en particulier une déshydratation thermique à chaud sous vide ou DHT, ou une réticulation chimique, en particulier au diphenylphosphorylazide ou DPPA, avec une aldéhyde telle que glutaraldéhyde, au carbodiimide et/ou succinimide.

20. Procédé selon l'une des revendications 12 à 19, caractérisé en ce qu'on ajoute lors de la fabrication un composé favorisant le développement cellulaire, en particulier un facteur de croissance, en particulier une cytokine, une chimiokine.

21. Procédé selon l'une des revendications 12 à 20, caractérisé en ce qu'on prévoit une étape d'introduction de cellules vivantes, normales ou modifiées génétiquement, ou malignes dans au moins une des deux couches, en particulier provenant de sujets jeunes ou âgés.

5 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que lesdites cellules vivantes sont choisies parmi le groupe consistant de fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, en particulier macrophages ou lymphocytes, des chondrocytes, cellules osseuses en particulier ostéoblastes,
10 cellules de Merkel d'origine sanguine, des sébocytes, des adipocytes, des cellules nerveuses.

23. Procédé selon l'une des revendications 12 à 22, caractérisé en ce qu'on introduit des fibroblastes dans la couche poreuse.

24. Procédé selon l'une des revendications 12 à 23, caractérisé en ce
15 qu'on dépose des cellules vivantes à la surface de la membrane compacte, en particulier choisies parmi des kératinocytes, des mélanocytes, des cellules de Merkel d'origine sanguine, des cellules de langerhans d'origine sanguine, des sébocytes, des cellules d'origine sanguine, des cellules nerveuses.

25. Procédé selon l'une des revendications 12 à 24, caractérisé en ce
20 que les cellules vivantes sont apportées soit par culture séquentielle, soit par culture concomitante entre les différents types de cellules, ces cellules provenant de culture ou de biopsie.

26. Utilisation du produit composite formant un support collagénique tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 11, ou tel qu'obtenu par le
25 procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 25 pour la fabrication de peaux artificielles destinées notamment à réaliser des essais in vitro d'efficacité de substance potentiellement active, ou à reconstruire in vivo des zones de peau endommagées.

27. Utilisation selon la revendication 26, caractérisée en ce que les
30 peaux artificielles sont obtenues soit sensiblement exclusivement à partir de cellules jeunes, soit sensiblement exclusivement à partir de cellules âgées, en particulier pour étudier le processus de vieillissement tissulaire et en particulier cutané et éventuellement tester l'efficacité de principes actifs sur ce processus.

2/3

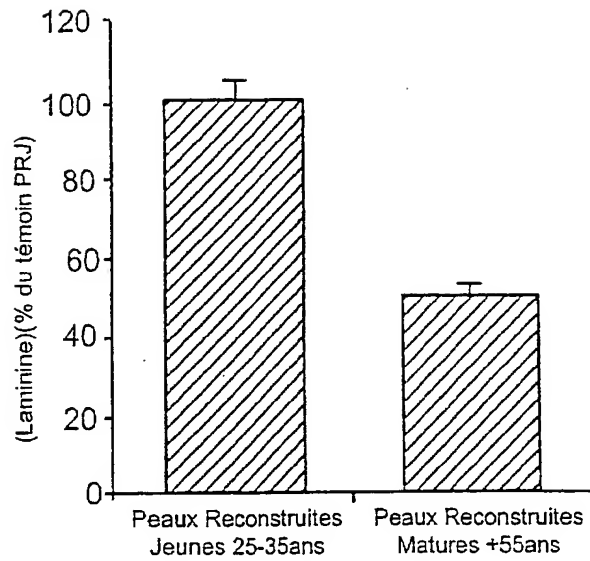


FIG.3

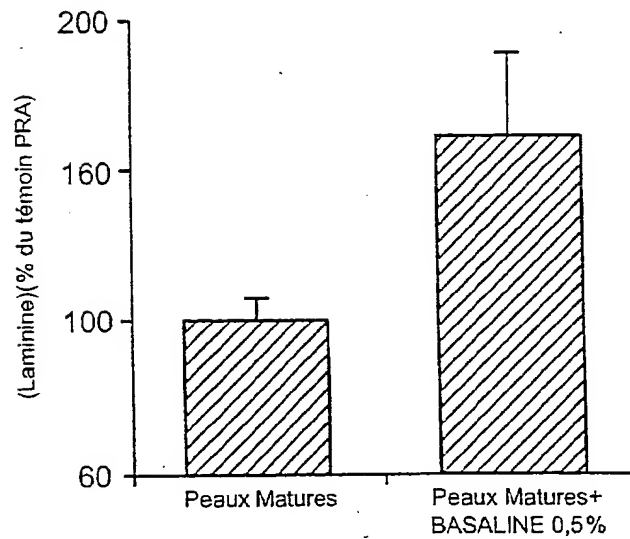
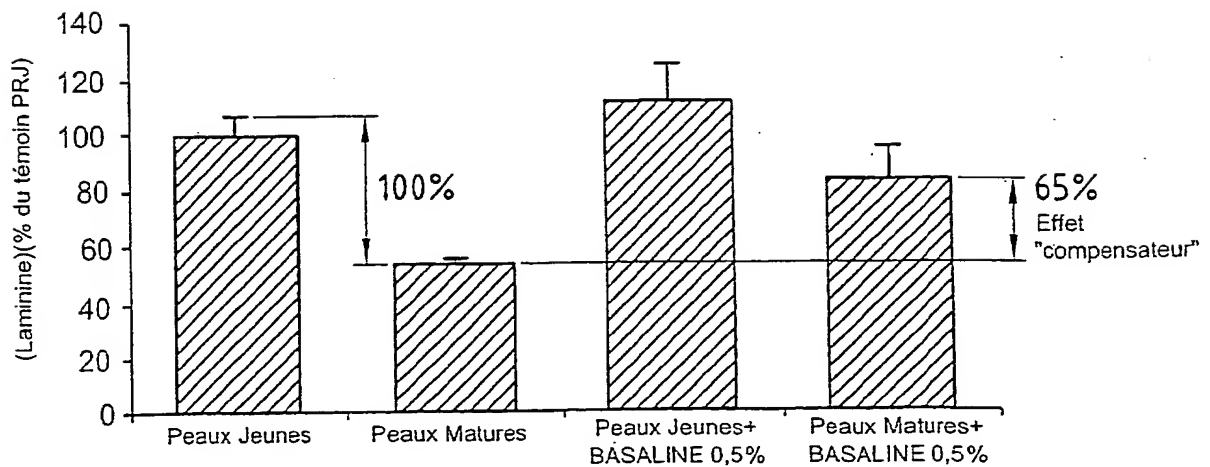


FIG.4



1/3

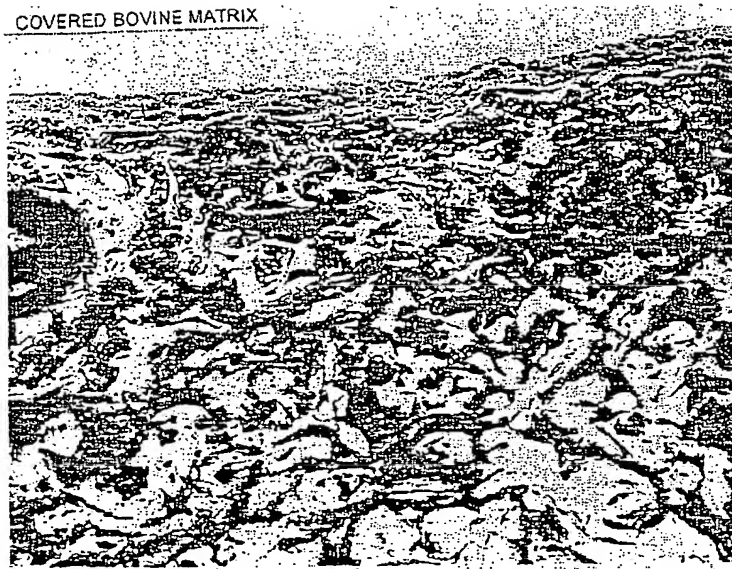


FIG.1
INVENTION

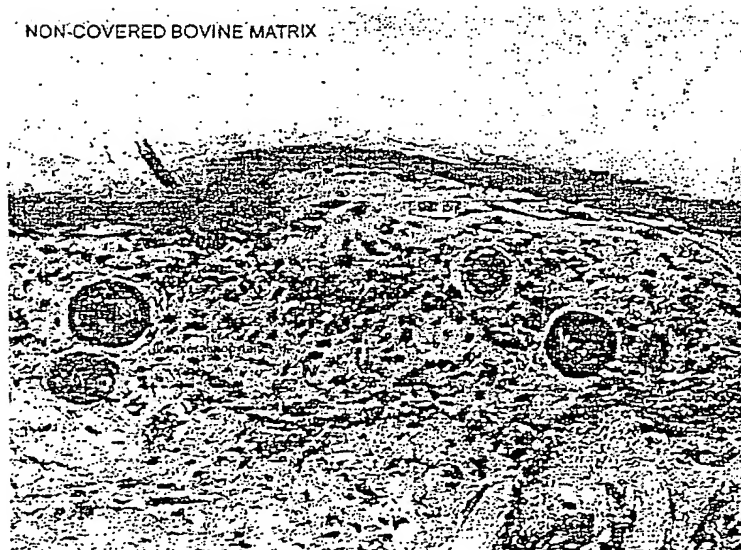


FIG.2
ADT ANTIDIETID

BEST AVAILABLE COPY

3/3

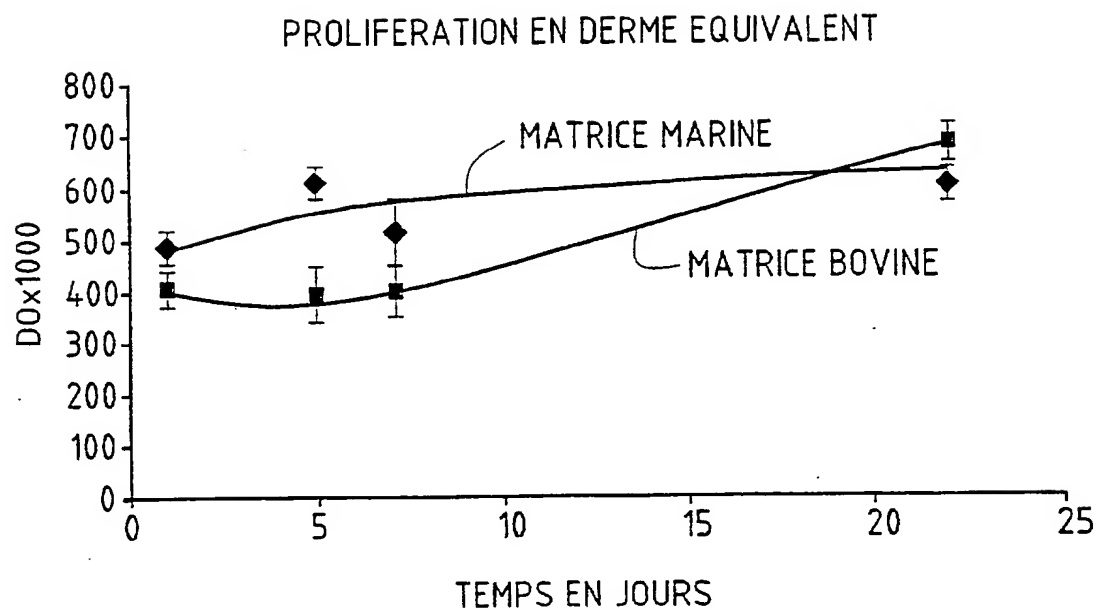


FIG.6

